

انتشار دیسک به روش پتری دیش خطکش دار

محمد فاطمی مطلق* *BSc*، نادر منصوری^۱ *BSc*

*آزمایشگاه میکروپزشناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
^۱گروه کامپیوتر، دانشکده مهندسی کامپیوتر، دانشگاه پیام نور، ایلام، ایران

چکیده

اهداف: بر اثر عواملی مانند مصرف بی‌رویه دارو، باکتری‌ها می‌توانند نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت پیدا کنند. آزمون آنتی‌بیوگرام برای سنجش میزان توانایی آنتی‌بیوتیک یا سایر عوامل ضد میکروبی در ممانعت از رشد باکتری‌ها در آزمایشگاه به کار می‌رود. براساس داده‌های CLSI در ژانویه سال ۲۰۰۶ در خصوص آزمون انتشار دیسک، تاثیر ۹۲ آنتی‌بیوتیک با ۳۲۹ آزمایش مختلف روی باکتری‌های متفاوت سنجیده شده است. دیسک‌گذاری استاندارد معمول در فاصله ۱۵ میلی‌متری حاشیه پلیت‌ها انجام می‌شود. هدف از این مطالعه، ابداع ابزاری جدید برای اندازه‌گیری حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها بود.

مواد و روش‌ها: در پلیت مدرج جدید و روش استفاده آن، دیسک‌گذاری بدون فاصله از حاشیه پلیت و با استفاده از دیسک کامل یا نیم‌دیسک انجام شد.

یافته‌ها: عدم وجود فاصله با حاشیه پلیت، نه تنها اثر منفی بر نتایج حاصل نداشت بلکه موجب دقت بیشتر آن و کاهش مشکلات و اشتباهات و تداخل‌های ناخواسته در روش‌های گذشته شد.

نتیجه‌گیری: استفاده از این پلیت و روش همراه آن، بازدهی آزمون انتشار دیسک را بین ۳ تا ۱۷٪ در پلیت با اندازه‌های ۸۴-۱۲۰ میلی‌متر بالاتر می‌برد.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌بیوتیک، آزمون دیسک‌دیفیوژن، دیسک‌گذاری، هاله‌های عدم رشد، تداخل هاله‌های عدم رشد، پلیت

Disc diffusion test by scaled Petri dish

Fatemi Motlagh M.* *BSc*, Mansoury N.¹ *BSc*

*Microbiology Laboratory, Faculty of Veterinary, Ilam University, Ilam, Iran

¹Department of Computer, Faculty of Computer Engineering, Payam-e-Noor University, Ilam, Iran

Abstract

Aims: As a result of several factors such as excessive use of drug, bacteria can resist against antibiotics. Anti-biogram test is used to assess the antibiotic or the other antimicrobial agents' ability in prevention from bacteria's growth in laboratory. Based on the CLSI data in January 2006, regarding the disc diffusion test, the effect of 92 antibiotics have been evaluated with 329 different tests with different bacteria. Common standard disc dispensing is carried out with 15mm distance from the plate border. The aim of the study was to introduce a new tool for measuring the microorganisms' sensitivity to antibiotics.

Materials & Methods: In the graded new plate and its using method, disc dispensing was done without any distance from plate border and using a full or half-disk.

Results: The lack of distance from plate border, not only had no negative effect on the results but also led to the higher accuracy and reduction of problems and errors and unwanted interference in the previous methods.

Conclusion: The use of this plate and its method increases the efficiency of the disc diffusion test between 3-17% in the plates with standard sizes of 84-120 mm.

Keywords: Antibiotic, Disc Diffusion Test, Dispensing Disc, Non-Growth Haloes, Non-Growth Haloes Interference, Plate

مقدمه

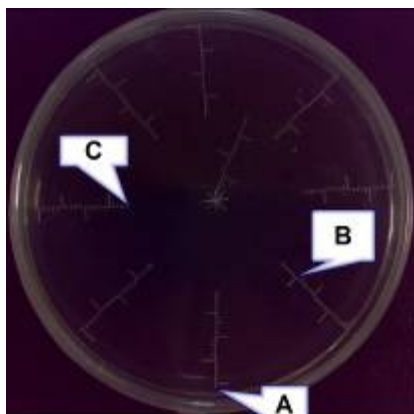
بر اثر عواملی مانند مصرف بی‌رویه دارو، باکتری‌ها می‌توانند نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت پیدا کنند [۱]. امروزه این موضوع، مشکل بزرگی ایجاد کرده است و شاید همین امر باعث پیدایش روزافزون آنتی‌بیوتیک‌های جدید شده است. آزمون آنتی‌بیوگرام عبارت از سنجش میزان توانایی آنتی‌بیوتیک یا سایر عوامل ضد میکروبی برای ممانعت از رشد باکتری‌ها در آزمایشگاه است. این توانایی را می‌توان با استفاده از روش‌های رقت‌سازی در لوله یا کشت میکروارگانیزم در پلیت اندازه‌گیری نمود [۲، ۳]. پزشک می‌تواند با استفاده از آنتی‌بیوگرام، بهترین عامل ضد میکروبی را انتخاب نموده، ضمن درمان موفق و به موقع بیماران، مانع از ایجاد میکروب‌های مقاوم به دارو شود. با توجه به این که روش انتشار دیسک معمول، دارای معایبی از جمله نیاز به خواندن توسط خط‌کش یا دستگاه‌های پرهزینه پیچیده و همچنین تداخل ناخواسته هاله‌های عدم رشد به علت محل دیسک‌گذاری نامناسب توسط دستگاه دیسک‌گذار یا روش دستی اتفاقی است، هدف این مطالعه، آزمایش انتشار دیسک به روش پتری‌دیش خط‌کش‌دار به منظور رفع این معایب بود.

مواد و روش‌ها

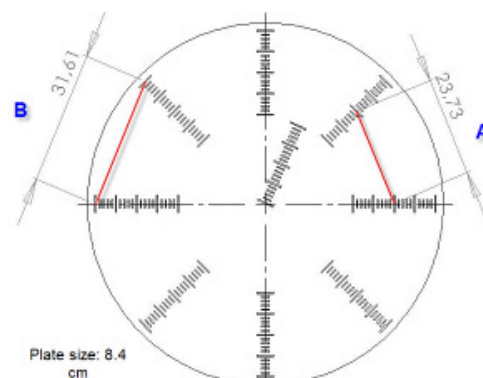
با آمارگیری ساده در داده‌های CLSI درباره تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت (انروفلوکساسین، فورازولیدون، فلومکوبین، آمپی‌سیلین، فلورفنیکل، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تایلوزین، نیومایسین، باسی‌تراسین و لینکوسپکتین) بر ارگانیزم‌های مختلف، مشخص شد که ۹۹/۷٪ هاله‌های عدم رشد تشکیل شده، در محدوده قطر ۴۲ میلی‌متر قرار می‌گیرند (شکل ۱). با توجه به این قطر و استفاده از پلیت رایج ۸۴ میلی‌متری (لابترون؛ ایران) و نرم‌افزار سالدورکس (طراحی سه‌بُعدی)، بهترین موقعیت دیسک‌گذاری در پلیت‌ها مشخص و این محل برای مدرج‌کردن و تعبیه خط‌کش، مورد استفاده قرار گرفت [۴].

ابتدا درب ۱۰۰ پلیت ۸۴ میلی‌متری را با فیلم‌های آزمایشگاهی (پارافیلیم؛ ایالات متحده) کاملاً بسته و از باز شدن و خارج شدن آنها از حالت استریل جلوگیری به عمل آمد. سپس کار بر کف (قسمت تحتانی) پلیت آغاز شد. ابتدا مرکز پلیت‌ها مشخص و بعد از آن ۴ گوشه و بعد ۸ گوشه آن (برای کشت ۹ آنتی‌بیوتیک) مشخص شد. پس از مشخص کردن محل قرارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی، از آن قسمت، شعاع حداکثری (۲۱ میلی‌متر) برای هر دیسک رسم و مدرج شد (روی فواصل مختلف هر یک از این خطوط مدرج می‌توان دیسک‌گذاری کرد). بعد از دیسک‌گذاری، با رشد هاله‌های عدم رشد از این قسمت‌ها، شعاع هاله به دست آمد و بعد از دوبرابر کردن، به صورت قطر هاله عدم رشد گزارش شد. البته بعد از انجام عمل خط‌کشی و برای اطمینان از استریل بودن این پلیت‌ها، آنها را به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه استریل ماوراءبنفش (OSK؛ ژاپن) قرار داده تا هر گونه احتمال آلودگی به حداقل ممکن کاهش یابد (به علت پلاستیکی بودن و یک‌بار مصرف بودن نمی‌توان آنها را اتوکلاو کرد). در مجموع برای هر حالت از محیط‌های کشت و موقعیت دیسک‌گذاری، ۳۳ پلیت مورد استفاده قرار گرفت (۳۳ بار تکرار آزمون و در مجموع ۹۹ بار تکرار آزمون انجام شد).

هر کدام از محیط‌های کشت میکروبی نوترینت‌آگار، بلاداگار و مک‌کانکی‌آگار (Merck؛ آلمان) به صورت جداگانه و طبق پروتکل شرکت سازنده آماده شدند. کشت باکتری *کلیسیلا نومونیا* (PTCC:1053, ATCC:10031, PCI:602, NCIB:9111) انجام شد. برای اطمینان از کار انجام‌شده و عدم آلودگی، محیط کشت و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از این زمان، پلیت‌ها از دستگاه خارج و با محیط، هم‌دمای شدند. همچنین دیسک‌های آنتی‌بیوتیک که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بودند نیز در محیط آزمایشگاهی قرار گرفته و به مدت ۳۰ دقیقه هم‌دمایی انجام شد.



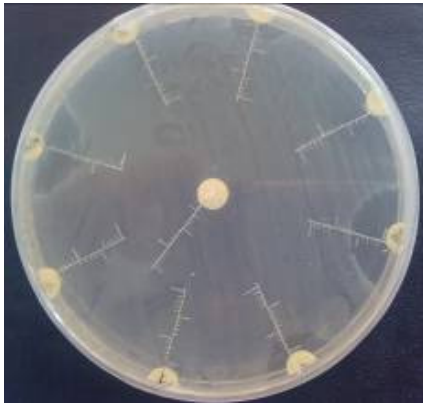
شکل ۲ محل‌های قرارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در آزمایش‌های انجام‌شده. (A) محل قرارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوگرام با روش افزایش مساحت پلیت بدون تغییر اندازه و فقط با تغییر موقعیت دیسک‌ها؛ (B) محل قرارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوگرام با دیسک دیسپنسرهای استاندارد؛ (C) محل قرارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوگرام در روش تداخل سنجی دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (تحقیقاتی).



شکل ۱ مقایسه روش قدیمی دیسک‌گذاری در پلیت‌های اندازه ۸۴ میلی‌متر با روش پیشنهادی در پلیت‌های جدید با ۹ دیسک (A) قطر هاله عدم رشد ایجادشده در محل دیسک‌گذاری قدیمی بدون تداخل به میلی‌متر؛ (B) قطر هاله عدم رشد ایجادشده در محل دیسک‌گذاری جدید بدون تداخل به میلی‌متر. تذکر: تمام اعدادی که در دراونینگ‌ها بدون واحد ذکر شده‌اند، با مقیاس میلی‌متر محاسبه شوند.

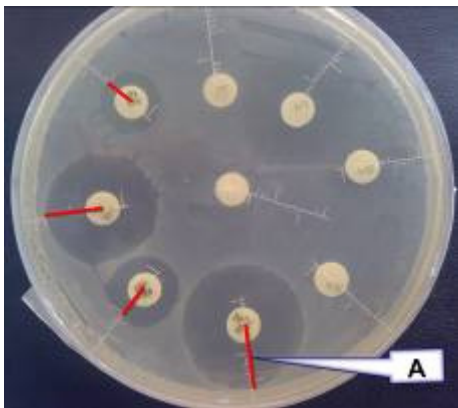
انتشار دیسک به روش پتری دیش خطکش دار ۷۳

نیم‌دایره در حاشیه پلیت‌ها بود که مانند روش الف، شعاع به‌دست‌آمده توسط خود پلیت در عدد ۲ ضرب شد و قطر هاله عدم رشد به‌دست آمد.



شکل ۴) قرارگیری نیم‌دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در حاشیه پلیت.

روش خواندن آزمون آنتی‌بیوگرام با این پلیت نوین بسیار ساده و سریع و بدون نیاز به از استفاده از خطکش است. به این صورت که با قرار گرفتن دیسک‌های آنتی‌بیوگرام روی قسمت انتهایی یا هر قسمت از خط مدرج، در صورت واکنش باکتری با دیسک و تشکیل هاله عدم رشد (دایره کامل یا نیم‌دایره) نتیجه خوانده می‌شود که در صورت تشکیل نیم‌دایره، شعاع هاله عدم رشد با ضرب در عدد ۲ گزارش می‌شود و در صورت تشکیل هاله عدم رشد به‌صورت دایره کامل، همان عدد به‌عنوان قطر هاله عدم رشد گزارش خواهد شد که این اعداد از خطکش‌های کوچکی که همان محل قرارگیری دیسک‌ها روی پلیت مدرج شده است، استخراج و به‌راحتی گزارش می‌شوند (شکل ۵).



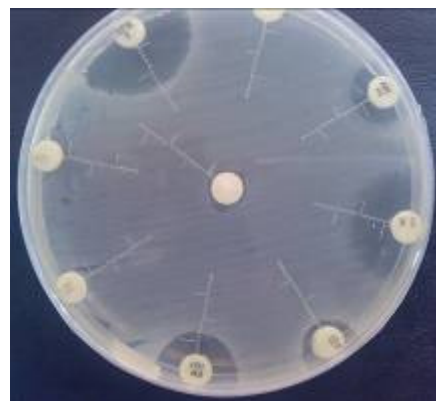
شکل ۵) روش خواندن هاله‌های عدم رشد. خط قرمز (A) نشان‌دهنده شعاع هاله‌های عدم رشد دیسک‌های آنتی‌بیوتیک است.

نتایج

نتایج تعیین بهترین محل دیسک‌گذاری طبق داده‌های CLS در جداول ۱، ۲ و ۳ آمده است. در این جداول، A نشانگر هاله‌های عدم رشد بدون تداخل تا قطر، B نشانگر تعداد حالات مختلف آزمایش‌شده

این پلیت نوین که طی تحقیقات به‌عمل‌آمده برای اولین بار در جهان ساخته شده، در اندازه‌های ۶۰، ۸۴، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌متری طراحی شده است. آزمون‌های تایید کارایی پلیت جدید، روی پلیت ۸۴ میلی‌متری انجام گرفت (شکل ۲). پلیت‌ها و روش‌های مختلفی در زمینه آزمون انتشار دیسک، وسایل و روش‌های مختلف آن و دیگر آزمون‌های مربوط به حساسیت‌سنجی آنتی‌بیوتیکی در سرتاسر جهان مورد بررسی قرار گرفته است [۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱]. در این پلیت، محل قرارگیری دیسک‌های آنتی‌بیوتیک، مشخص و امتداد محل قرارگیری این دیسک‌ها به‌صورت خطکش، مدرج شده است. در نتیجه بعد از ریختن محیط کشت و کشت دادن باکتری موردنظر، دیسک در محل‌های از پیش تعیین‌شده قرار داده شده و بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن، نتیجه آزمایش بدون استفاده از خطکش خوانده و ثبت می‌شود. تعداد آزمون‌های انجام‌شده از لحاظ موقعیت قرارگیری دیسک‌ها، ۳ نوع موقعیت، از لحاظ محیط‌های کشت استفاده‌شده، ۳ نوع محیط کشت و از لحاظ اندازه دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با ۲ نوع دیسک آنتی‌بیوگرام (دایره کامل و نیم‌دایره) انجام گرفت:

الف) محل دیسک‌ها در حاشیه (دیسک به‌صورت دایره کامل): این آزمایش روی پلیت‌های حاوی محیط کشت‌های مولر-هینتون‌آگار، نوترینت‌آگار و بلادآگار انجام شد. قطر هر دیسک آنتی‌بیوتیک ۶ میلی‌متر بود و بر همین اساس پلیت‌های ۸۴ میلی‌متری با فاصله ۳ میلی‌متر از حاشیه و به‌طول ۲۱ میلی‌متر قبل از ریختن محیط کشت درون پلیت‌ها، مدرج شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در مرکز با فاصله ۳ میلی‌متری قرار داده شد و بعد از ۲۴ ساعت انکوبه کردن، هاله‌های عدم رشد به‌صورت نیم‌دایره تشکیل و شعاع عدم رشد حاصل شد که آن را در عدد ۲ ضرب کرده و قطر هاله عدم رشد به‌دست آمد (شکل ۳).



شکل ۳) قرارگیری دیسک‌های کامل در حاشیه دیسک برای کاهش ریسک تداخل ناخواسته هاله‌های عدم رشد.

ب) محل دیسک‌ها در حاشیه (دیسک به‌صورت نیم‌دایره): در این آزمون، دیسک‌های آنتی‌بیوگرام به دو نیم تقسیم شده و در حاشیه پلیت‌ها و در محل انتهایی قسمت مدرج قرار گرفتند (شکل ۴). نتیجه آزمون بعد از عمل انکوبه کردن، تشکیل هاله‌های عدم رشد به‌صورت

دارد که یکی از این روش‌ها، روش مدرج کردن و تعیین محل استقرار دیسک‌های آنتی‌بیوگرام بوده که باعث حل مشکلات دیسک‌گذاری و خطاهای موجود خواهد شد. در ضمن، سهولت خواندن و ساده کردن آزمون آنتی‌بیوگرام را نیز به‌همراه دارد.

با انجام این آزمایشات و مقایسه آن با داده‌های موجود و آزمون‌های شاهد و نیز مقایسه صورت‌گرفته با روش‌ها و وسایل قبلی موجود در رابطه با آزمون انتشار دیسک، چنین دریافت شد که استفاده از این پلیت‌های نوین بسیار کم‌هزینه‌تر، باصرفه‌تر، سریع‌تر و با میزان خطای کمتر است. از این پلیت هم می‌توان (با همان هزینه‌های ساخت پلیت‌های معمولی)، با نادیده گرفتن درجه‌بندی کف پلیت به‌عنوان پلیت معمولی استفاده کرد و هم می‌توان آن را به‌عنوان ابزاری اختصاصی و منحصر برای آزمون انتشار دیسک و سنجش مقاومت قارچ‌ها مورد استفاده قرار داد.

این پلیت جدید و روش استفاده مربوط به آن، هیچ‌گونه تاثیر شیمیایی و افزایش یا کاهش قدرت آنتی‌بیوتیک‌ها یا اندازه هاله‌های عدم رشد را در بر نداشته و این اختراع کاملاً مکانیکی و فیزیکی است و این آزمون‌ها برای تایید نتیجه‌خوانی و سرعت عمل و امکان تداخل ناخواسته هاله‌ها و خطاهای احتمالی صورت گرفتند.

طبق داده‌های CLSI در ژانویه سال ۲۰۰۶ درباره آزمون انتشار دیسک، ۹۲ آنتی‌بیوتیک با ۳۲۹ حالت مختلف، آزمایش شده که نتایج آن به تفصیل آمده است. محل دیسک‌گذاری‌های استاندارد معمول با فاصله ۱۵ mm از حاشیه پلیت‌ها انجام می‌شود [۱۲]. در این پلیت مدرج جدید و روش همراه آن پیشنهاد می‌شود که این فاصله به صفر تغییر یافته و آنتی‌بیوتیک‌ها در حاشیه پلیت و به‌صورت دیسک کامل یا نیم‌دیسک مورد استفاده قرار گیرند.

با توجه به آزمایشات انجام‌شده در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ایلام و نتایج حاصل ثابت شد که این فاصله نه تنها اثر منفی بر نتایج حاصل نداشته، بلکه موجب دقت بیشتر آن و کاهش مشکلات و اشتباهات و تداخل‌های ناخواسته در روش‌های گذشته می‌شود.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج به‌دست‌آمده، استفاده از این پلیت و روش همراه آن، بازدهی آزمون انتشار دیسک را نسبت به پلیت و روش‌های گذشته، ۱۷/۶۴-۳/۰۵٪ در پلیت با اندازه‌های ۱۲۰-۸۴ میلی‌متر بالاتر می‌برد.

تشکر و قدردانی: در پایان از آقایان، دکتر هدایت‌علی وره‌رام، دکتر علی‌محمد بهرامی، دکتر مروت طاهری کلانسی و عباس فرمانی که ما را در مراحل مختلف کار یاری نمودند و همچنین دانشکده دامپزشکی ایلام که امکانات لازم را در اختیار گروه قرار داد، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

با ۹۲ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی در داده‌های CLSI تا ژانویه ۲۰۰۶ بدون تداخل هاله‌های عدم رشد، C نشانگر درصد تعداد حالات مختلف آزمایش‌شده با ۹۲ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی در داده‌های CLSI تا ژانویه ۲۰۰۶ بدون تداخل هاله‌های عدم رشد، D نشانگر مساحت اضافه‌شده برای هر هاله عدم رشد بدون تداخل در روش جدید، E نشانگر تعداد آزمایشات انتشار دیسک قابل انجام بدون تداخل هاله‌ای نسبت به روش قدیمی و F نشانگر بازدهی روش پلیت جدید نسبت به روش استاندارد قدیمی انتشار دیسک با پلیت است. ۵ آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین، فلومکوبین، فورازولیدون، آمپی‌سیلین و فلورفنیکل به‌ترتیب هاله‌های عدم رشدی به قطر ۲۴، ۱۲، ۲۲، ۱۶ و ۲۲ میلی‌متر ایجاد کردند (شکل ۳ و ۴).

جدول ۱) حداکثر مساحت هاله‌های عدم رشد برای دیسک‌گذاری بدون تداخل

هاله‌ای در روش پلیت قدیمی				
قطر پلیت ←	۱۲۰	۱۰۰	۹۰	۸۴
متغیر ↓	(میلی‌متر)	(میلی‌متر)	(میلی‌متر)	(میلی‌متر)
A (میلی‌متر)	≤۳۵	≤۲۷	≤۲۴	≤۲۲
B (تعداد)	۳۱۸	۲۹۶	۲۸۳	۲۵۸
C (درصد)	۹۶/۶۵	۸۹/۹۶	۸۶/۰۱	۷۸/۴۱

جدول ۲) هاله‌های عدم رشد و حداکثر مساحت برای دیسک‌گذاری بدون

تداخل هاله‌ای در روش پلیت جدید				
قطر پلیت ←	۱۲۰	۱۰۰	۹۰	۸۴
متغیر ↓	(میلی‌متر)	(میلی‌متر)	(میلی‌متر)	(میلی‌متر)
A (میلی‌متر)	≤۴۴	≤۳۸	≤۳۴	≤۳۳
B (تعداد)	۳۱۶	۳۱۹	۳۲۷	۳۲۸
C (درصد)	۹۹/۷	۹۹/۴	۹۶/۹۷	۹۶/۰۵

جدول ۳) مقایسه روش قدیمی و جدید و پیشرفت‌های آن

قطر پلیت ←	۱۲۰	۱۰۰	۹۰	۸۴
متغیر ↓	(میلی‌متر)	(میلی‌متر)	(میلی‌متر)	(میلی‌متر)
D (میلی‌متر)	۹	۱۱	۱۰	۱۱
E (تعداد)	۱۰	۳۱	۳۶	۵۸
F (درصد)	۳/۰۵	۹/۴۴	۱۰/۹۶	۱۷/۶۴

این روش باعث کاهش مصرف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تا ۵۰٪، افزایش مساحت پلیت‌ها برای دیسک‌گذاری به نزدیک ۱/۵ برابر معمول، جلوگیری از تداخل و تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت ناخواسته و خواندن آسان نتایج شد. همچنین نیازی به استفاده از خط‌کش نبود.

بحث

آزمون آنتی‌بیوگرام از آزمون‌های معمول آزمایشگاهی و تشخیصی است که برای انجام آن معمولاً از پلیت استفاده می‌شود. راه‌های زیادی برای بهبود و توسعه این محصول ارزشمند آزمایشگاهی وجود

- 7- Billups JO, inventor; Billups-Rothenberg, Inc., assignee. Culture chamber. United States patent US 3,886,047, 1975 May 27.
- 8- Edelman A, Pietzcker T, Wellinghausen N. Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. *J Medical Microbiol.* 2007;56:202-7.
- 9- Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1415-8.
- 10- Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol.* 1994;32(7):1757-62.
- 11- Fay D, Oldfather JE. Standardization of direct susceptibility test for blood cultures. *J Clin Microbiol.* 1979;9(3):347-50.
- 12- Cls I. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement. *Clin Lab Stand.* 2006;26(3):588-9.

منابع

- 1- Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Engl J Med.* 2001;344:1294-1303.
- 2- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Wayne: Standards; 1999.
- 3- Odland BA, Erwin ME, Jones RN. Control guidelines for disk diffusion and broth microdilution antimicrobial susceptibility tests with seven drugs for veterinary applications. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):453-5.
- 4- Scavizzi MA, Labia R, Petitjean OJ, Elbhar A. Antimicrobial susceptibility test: From bacterial population analysis therapy. *Int J Antimicrobial Agents.* 2002;19:9-20.
- 5- Solidworks. 3D CAD Design Software [CD-ROM]. Massachusetts: Dassault Systems Solidworks Corp; 2008.
- 6- Labarthe JC, inventor; 3F Therapeutics, Inc., assignee. Culture dish. United States patent US 5,348,885, 1994 Sep 20.